

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12753

研究課題名(和文) 光親和性プローブとLA-LDI-MSを用いた標的生体分子の結合部位解析法の開発

研究課題名(英文) Development of the binding position analysis of target biomolecules by using photoaffinity probes and LA-LDI MS

研究代表者

北 将樹 (KITA, Masaki)

筑波大学・数理物質系・准教授

研究者番号：30335012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ラベル支援レーザー脱離イオン化質量分析法(LA-LDI MS)を用いて、プローブと結合した断片ペプチドを選択的かつ高効率に検出できる光親和性プローブを創出し、新たな結合位置解析法を開発することを目指した。まず、LA-LDI MSおよびMS/MS解析に適用できる6-アミドピレン(apy)基を見出した。ついで光反応基(ジアジリン基)を持つ抗腫瘍性天然物アプリーニンAのapyプローブを合成し、これが溶媒分子と高効率で共有結合することを見出した。さらにNHS基を持つアプリーニンAのapyプローブを合成し、アクチンの定量的なラベル化とラベル化ペプチドの配列決定に成功した。

研究成果の概要(英文)：To establish new binding mode analysis methods of target biomacromolecules, we aimed to develop photoaffinity probes that can covalently bind to target molecules and efficiently analyze their fragment peptides by using label-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (LA-LDI MS). We found that 6-amidopyrene (apy) derivatives were highly detectable by the LDl MS instrument. An apy-conjugated photoaffinity derivative of an antitumor natural product, aplyronine A, was then synthesized. By the irradiation of UV light (365 nm), this probe efficiently photoreacted with solvent molecules and form covalent bonds. Furthermore, actin was quantitatively labeled with an apy NHS ester probe of aplyronine A, and the sequence of an apy-labeled peptide was established by MS/MS analysis.

研究分野：天然物有機化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：天然物ケミカルバイオロジー 標的分子同定 質量分析法 光親和性プローブ LA-LDI MS

1. 研究開始当初の背景

強力な生理活性を示す化合物 (リガンド) の標的分子の同定や結合位置の解明は、ケミカルバイオロジーや創薬研究において重要である。その解析法の一つに、リガンドに反応基と検出基を導入した誘導体 (ケミカルプローブ) を用いる方法がある。標的分子がタンパク質の場合、ラベル化反応後、酵素消化により得られる断片ペプチドを MALDI、ESI など高感度な質量分析法で解析する PMF 解析により、標的分子の種類や結合位置を決定できる。本手法は、標的分子とリガンドの相互作用が弱い場合や、標的分子が不安定な場合など、X 線や NMR 解析が困難な場合にも適用できる。一方で、ラベル化効率の低いことや、目的のペプチドフラグメントの精製や検出法などに課題があり、より高感度な手法の開発が望まれていた。

2. 研究の目的

そこで、標的タンパク質のラベル化反応と酵素消化を行うだけで、プローブと結合した標的分子由来の断片ペプチドを、選択的かつ高感度で検出できるケミカルプローブを創製し、新たな結合位置解析法を開発することを目指した。芳香族炭化水素であるピレン基を持つ化合物は、紫外線レーザーにより分子自身が励起され、イオン化する。よって、MALDI 法で必要なマトリックスを使用しないラベル支援レーザー脱離イオン化法 (label-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, LA-LDI MS) で検出される。よって、検出基としてピレン基を持つケミカルプローブを用いて標的タンパク質のラベル化と酵素消化を行い、得られたペプチド混合物の LA-LDI MS を測定すれば、ラベル化ペプチドを精製せずに、選択的に検出できると考えた。さらに、リガンドの結合部位や複合体の結晶構造に基づいて、計算科学のアプローチを組み合わせることで、プローブの結合部位を予測し、これを MS 解析と比較することで、その有用性を実証することを目指した。

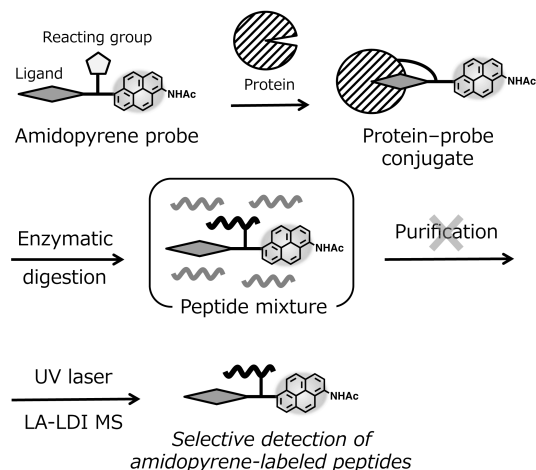


図 1. LA-LDI MS を用いた標的タンパク質の結合位置解析法

3. 研究の方法

(1) アミドピレン誘導体の合成

米国 Stanford 大の Kozmin らは、励起波長 355 nm の Nd:YAG レーザーを備えた UltraXtreme-TN 型装置 (Bruker Daltonics 社) を用いた LA-LDI MS により、1-ピレン酪酸 (**1**) を 35 nmol 量で検出した。我々も同じ装置で検討し、**1** を 100 pmol 量で再現よく検出できることを確認した (図 2)。しかし、PMF 解析で一般的な μg - ng 量の標的タンパク質を扱うには、より高感度での測定が必要である。そこで、ピレン基の吸収極大波長を長波長側にシフトさせた 6-アミノおよび 6-アミドピレン誘導体 **2, 3** を合成した。

(2) apy ラベル化と LA-LDI MS 解析

6-アミドピレン (**3**) から 2 段階でアミドピレンの NHS エステル (apy-OSu, **4**) を合成し、塩化カルシウム-炭酸水素ナトリウム水溶液中、過剰量の **4** をアクチンと反応させることで、モノマーあたり 19 個含まれるリジン残基を非特異的にラベル化した。

4. 研究成果

(1) LA-LDI MS タグとして見出した 6-アミドピレン

LA-LDI MS を測定した結果、**2** は系内で酸化的二量化などが起こり、スペクトルが複雑化した。一方で、**3** は 0.1 pmol 量でも高い S/N 比で分子イオンピークが検出され、また MS 系内で McLafferty 転位によりケテン (CH_2CO , 分子量 42) が脱離することで、特徴的なフラグメントイオンとして **2** が検出された。以上から、6-アミドピレン (apy) 基が LA-LDI MS のすぐれた検出基であると評価した。

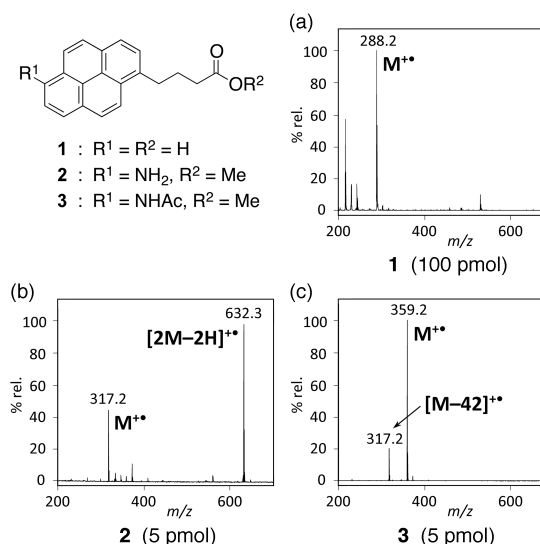


図 2. ピレン誘導体の LA-LDI MS

(2) アミドピレン基でラベル化した断片ペプチドの MS 解析

得られたラベル化アクチンをトリプシンで消化し、MS を測定した結果、MALDI 法ではラベル化および非ラベル化ペプチドのイ

オンピークが同程度観測されたのに対し、LA-LDI MS ではラベル化ペプチドがほぼ選択的に検出された (図 3)。MALDI 法に比べると検出感度が低いものの、LA-LDI 法でも分子量 4,000 Da 程度までのペプチドの MS/MS 解析ができることがわかった。

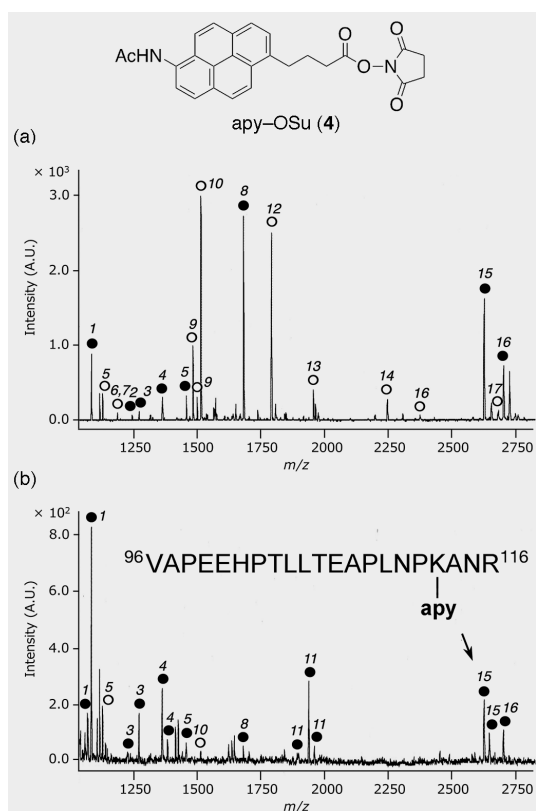


図 3. アミドピレンの NHS エステル(4)でラベル化したアクチン断片ペプチドの解析 (a) MALDI-TOF MS, (b) LA-LDI MS, 白丸は非ラベル化ペプチド, 黒丸はラベル化ペプチド。

(3) 抗腫瘍性物質アプリロニン A のアミドピレンプローブの設計と合成

本手法の有用性を評価するため、生理活性リガンドに apy 基を実際に導入することとした。海洋生物由来のアプリロニン A (ApA, 5) はアクチンを脱重合させ、モノマーのアクチンと 1:1 複合体を形成する(図 4)。一方で、ApA は既存のアクチン作用薬よりも低濃度で腫瘍細胞の増殖を抑制し、顕著な抗腫瘍活性を示す。我々はこれまでに、ApA の光親和性プローブなど様々なケミカルプローブを合成し、*in situ* (細胞内) 光ラベル化により ApA の第 2 標的分子としてチューブリンを同定した。さらに ApA がアクチン・チューブリン間のタンパク質間相互作用 (protein-protein interaction, PPI) を誘導し、アクチンと相乗的に微小管の重合や紡錘体形成を阻害することを発見した。本化合物の PPI 誘導作用は、ゲルろ過分析や、*in vitro* チューブリン重合阻害活性に加えて、表面プラズモン共鳴による速度論的解析からも解明した。ApA のように、アクチン-有機小分子の複合体がチューブリンに直接作用する、もしくは微小管阻害薬が

アクチンの重合ダイナミクスにも影響するという例はこれまでなく、本化合物の作用は非常にユニークと言える。

これまでの知見をもとに、ApA にジアジリン基、および PEG 鎖を介して apy 基を導入した光親和性アミドピレンプローブ (ApA-PaP, 6) を設計し、5 から 2 段階で合成した。プローブ 6 は、アクチン重合阻害活性、細胞毒性、有糸分裂の阻害など、ApA の強力な活性を保持していた。なお、アルキル鎖を介して apy 基をつないだ誘導体は、アクチンへの結合能を失った。この理由として、疎水性の高いピレン基が非特異的にアクチンと作用することや、非特異的な π - π 相互作用などによりプローブ分子同士で会合することが考えられた。よって 6 の PEG 鎖の存在は、プローブの溶解性に加えて、標的分子への結合能など、リガンドの生理活性にも重要な役割を果たしていると考えられた。

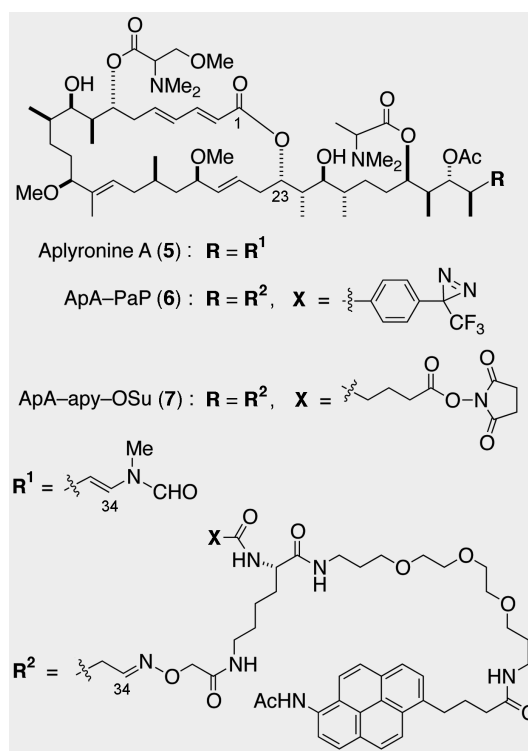


図 4. 抗腫瘍性物質アプリロニン A およびアミドピレン誘導体の構造

(4) アプリロニン A のアミドピレンプローブを用いたアクチンのラベル化

次に、アクチンに対する ApA-PaP (6) の光ラベル化を検討した。予備実験として、MeOH 中で 6 に 365 nm の紫外線を照射すると、42% という比較的高い収率で MeOH 付加体が見られ、紫外光を吸収する apy 基が分子内であっても、ジアジリン基が光反応基として機能することがわかった。ついで G-buffer 中でアクチンと 6 を混合して光反応を行い、複合体の MALDI-TOF MS を測定した。しかし、共有結合した複合体の分子イオンピークはほとんど検出されず、6 のラベル化効率是非常

に低いことがわかった。これは **6** がアクチンと 1:1 の複合体を形成するものの、アクチンの内部に含まれる水などの溶媒分子と反応したためと考えられた。

そこで、プローブのラベル化効率の向上を目指して、反応性官能基をジアジリン基から NHS 基に代えたアミドピレンプローブ (ApA-apy-OSu, **7**) を合成し、アクチンのラベル化を行った。複合体の SDS-PAGE および MALDI-TOF MS 解析から、**7** によるアクチンのラベル化はほぼ定量的に進行し、さらに過剰量の ApA (**5**) によりアクチンのラベル化が競合的に阻害されたことから、この反応が特異的であることがわかった。

(5) アプリロニン A プローブでラベル化したアクチン断片ペプチドの MS 解析および分子モデリング計算

プローブ **7** でラベル化したアクチンについて、トリプシンと Glu-C の 2 種類の酵素を用いて溶液内消化を行い、断片ペプチドの混合物を MALDI-TOF MS で測定した。その結果、ラベル化されていない多数の断片ペプチドに加えて、 m/z 2841.5 のラベル化ペプチドのピークが 1 本のみ観測された (図 5a)。さらに MS/MS 解析より、ラベル化ペプチドの構造を 113 番目の Lys 残基で **7** が共有結合した Ala¹⁰⁸-Arg¹¹⁶ と決定した。

このラベル化位置が妥当であるか確認するために、分子モデリング計算 (変化システム MOE) を検討した。アクチン-ApA 結晶構造 (PDB: 1WUA) を鋳型にして、プローブ **7** のリガンド部分 (ApA の C1-C34 位) をアクチンとともに固定し、残りのリンカー部分をアクチン表面上で自由に動かす配座探索を行った (図 6)。その結果、Lys¹¹³ 残基は ApA が結合するアクチンの SD1, SD3 間の疎水性クレフトに近い位置にあり、また最安定配座において、**7** の NHS 基と Lys¹¹³ 残基の -アミノ基の距離が 6.9 Å と非常に短いことがわかった。したがって、apy 基や反応基、PEG リンカーなどで修飾しても、**7** はもとの天然物リガンドと同じ様式でアクチンに結合したと考えられた。

続いて、ラベル化ペプチド混合物の LA-LDI MS を測定した結果、MALDI 法で観測された m/z 2841.5 のラベル化ペプチド、およびそれよりも 42 mu 少ないフラグメントイオンが観測されたが、いずれもピーク強度は低く、予想に反して非ラベル化ペプチドが多数検出された (図 5b)。観測されたものには、Tyr 残基や Trp 残基などの芳香族アミノ酸を含むものが多かったことから、これらの芳香環も弱いながらも LA-LDI MS で励起・イオン化され、ラベル化ペプチドの検出感度が低い場合には相対的に観測されることがわかった。なお、LA-LDI MS において m/z 531.2 のフラグメントイオンが基準ピークとして観測されたことから、MS 系内において apy 基とリガンド、ペプチド鎖をつなぐリンカー

部分で開裂したことが、ラベル化ペプチドの検出感度が低下した主な原因と考えられた。現在、リンカーの構造や反応性官能基などプローブの構造を改良し、ラベル化ペプチドの LA-LDI MS における検出感度の向上を目指している。

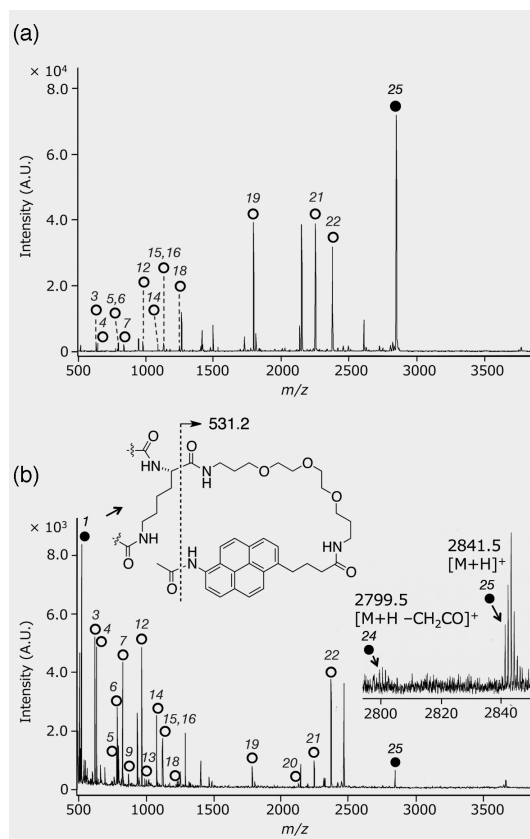


図 5. プローブ **7** でラベル化したアクチン断片化ペプチドの解析

(a) MALDI MS, (b) LA-LDI MS, 白丸は非ラベル化ペプチド, 黒丸はラベル化ペプチド.

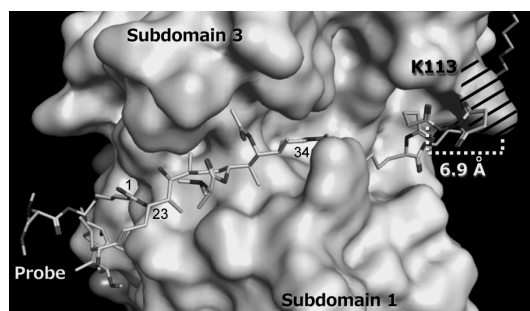


図 6. 分子モデリング計算 (LowModeMD 法、AMBER12-EHT 力場) により得られたアクチン-アミドピレンプローブ **4** の複合体の構造

(6) 今後の展望

今回、アミドピレン (apy) 基と LA-LDI-MS を用いた、標的分子の新たな結合部位解析法について報告した。また抗腫瘍性天然物アプリロニン A のアミドピレンプローブを用いて、標的タンパク質アクチンを定量的にラベル化し、その結合位置を LA-LDI MS で決定

し、さらに計算科学と組み合わせることで、リガンドの結合様式が妥当であることを評価できた。

本研究は、機器分析法の最先端研究をケミカルバイオロジー分野に応用することで、従来は不可能だった標的分子解析の高感度化と解析精度の向上を目指すものである。MALDI 型の質量分析装置やハイスループット PMF 解析法は、医療や創薬、生命科学研究などで広く普及しているが、LA-LDI MS は MALDI 法で添加するマトリックスを除くだけで測定できるので、特別な追加設備を必要としない。よって今回述べた標的分子の結合位置解析法は、生命科学の幅広い基礎研究や医薬品開発、臨床検査分野などでの応用に利用できると期待される。

今後は、LA-LDI MS に適した蛍光タグのさらなる改良に努めるとともに、標的分子-プローブ間の単純な系のみならず、細胞抽出液や培養細胞の系など、混合物におけるアミドピレンプローブを用いたラベル化反応や LA-LDI MS 解析も検討し、有用な結合位置解析法の開発を目指していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- ① K. Yoneda, Y. Hu, R. Watanabe, M. Kita, and H. Kigoshi: Binding position analysis of target proteins with the use of amidopyrene probes as LA-LDI enhancing probes. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 8564–8569 (2016). 査読有
DOI: 10.1039/c6ob01381c
- ② Y. Hirayama, K. Yamagishi, T. Suzuki, H. Kawagishi, M. Kita, and H. Kigoshi: Analysis of the aplyronine A-induced protein-protein interaction between actin and tubulin by surface plasmon resonance. *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 2809–2814 (2016). 査読有
DOI: 10.1016/j.bmc.2016.04.049
- ③ 北将樹, アクチン結合性天然物の新展開, *化学工業*, **67**, 647–653 (2016). 査読無
- ④ K. Yoneda, Y. Hu, M. Kita, and H. Kigoshi: Marine natural products that regulate multiple cytoskeletal protein interactions. *Nat. Prod. Rep.* **32**, 1–10 (2015). 査読有
DOI: 10.1038/srep17853
- ⑤ M. Kita and H. Kigoshi: Development of an aplyronine A photoaffinity amidopyrene derivative applicable for label-assisted LDI MS. *Sci. Rep.* **5**, 534–542 (2015). 査読有
DOI: 10.1039/c4np00129j

〔学会発表〕(計 23 件)

- ① 北将樹: タンパク質間相互作用を誘導する有機小分子、第 54 回日本生物物理学会年会 菱化システム(株)ランチョンセミナー、2016 年 11 月 25–27 日、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)、招待講演

- ② M. Kita, and H. Kigoshi: PPI-inducing marine macrolide. 8th US–Japan Symposium, 21th Century Innovations in Natural Products 2016. 2016 年 11 月 14–17 日, Hawaii University Manoa (米国ハワイ)、招待講演
- ③ 北将樹: タンパク質-生物活性リガンド相互作用を解析するケミカルプローブの開発、第 89 回日本生化学会大会シンポジウム「生物活性と創薬のケミカルバイオロジー」、2016 年 9 月 25–27 日、仙台国際センター (宮城県仙台市)、招待講演
- ④ 北将樹: タンパク質-天然物リガンド相互作用を解析するケミカルプローブの開発、新学術領域研究「天然物ケミカルバイオロジー: 分子標的と活性制御」地区ミニシンポジウム、2016 年 2 月 23–24 日、東京農工大学小金井キャンパス (東京都小金井市)、招待講演
- ⑤ M. Kita: Recent advances in the study of actin-targeting natural products. Future Dreams in Chemical Science and Technology: Bridges to Global Innovations. 北海道大学フロンティア化学教育研究センター国際シンポジウム、2016 年 2 月 23–24 日、北海道大学工学部 (北海道札幌市)、招待講演
- ⑥ 米田耕三、胡亜萍、北将樹、木越英夫: タンパク質-リガンド相互作用を解析する新しいケミカルプローブの開発、第 57 回天然有機化合物討論会、2015 年 9 月 9–11 日、神奈川県民ホール (神奈川県横浜市)、口頭

〔図書〕(計 1 件)

- ① 北将樹, 巨大海洋分子の魅力. 天然物の化学-魅力と展望- 第 7 章, 上村大輔 編, 東京化学同人 pp. 46–52 (2016).

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~chembio/index.html>

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
北 将樹 (KITA, Masaki)
筑波大学・数理物質系・准教授
研究者番号: 30335012